

République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة أمحمد بوقرة بومرداس

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA – BOUMERDES



Faculté des sciences  
Département de Biologie  
Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de  
MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie Végétale

## THÈME

---

Incorporation d'une protéase végétale dans la fabrication de  
fromage

*Cas de cynarases de l'artichaut*

---

Présenté par :

*Ben Ouali Abdelfattah  
Bouchena Abdelbasset  
Djamaai Abdelhak*

*Devant le Jury :*

<i>Mme Yahiaoui Karima</i>	<i>Présidente</i>	<i>MCA</i>	<i>UMBB</i>
<i>Melle Youyou Soraya</i>	<i>Examinatrice</i>	<i>MAA</i>	<i>UMBB</i>
<i>Melle Slamani Rosa</i>	<i>Promotrice</i>	<i>MR</i>	<i>INRAA</i>
<i>Mme Ait Kaki Sabrina</i>	<i>Co-Promotrice</i>	<i>MCA</i>	<i>UMBB</i>

2019/2020

# Remerciements

## Remerciements

*Nos remerciements vont*

*A M<sup>elle</sup> **SLAMANI Rosa**, Maitre de Recherche à l'INRAA de Baraki, d'avoir accepté de diriger ce travail avec compétence et dévouement, de partagé ses connaissances et tout son soutien lors de la réalisation de l'expérimentation ainsi que la rédaction du manuscrit. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*A Mme. **AIT SLIMANE-AIT KAKI Sabrina**, Maitre de Conférences A. au département de biologie de l'Université M'Hamed Bougara, d'avoir accepté de co-diriger. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*A Mme **Yahiaoui Karima**, Maitre de Conférences A. au département de biologie de l'Université M'Hamed Bougara, de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury. Nous la remercions vivement.*

*A Mme **Youyou Soraya**, Maitre-assistant A au département de biologie de l'Université M'Hamed Bougara, de nous avoir fait l'honneur d'être membre de ce jury et d'examiner ce travail, son expérience sera bénéfique pour la valorisation de ce travail. Nous la remercions très sincèrement.*

*Nos sincères remerciements vont aussi à l'égard de madame **DALI** de l'ITELV, responsable du service « petits ruminants » à l'ITELV, qui nous a bien reçus dans l'atelier fromager lors de la réalisation de l'essai de fabrication de fromage.*

*Nos remerciements vont à Monsieur **BRAHIM**, agriculteur, qui a bien voulu nous approvisionné en artichaut.*

*Enfin nos remerciements sont aussi adressés, à toute personne ayant contribué de près ou de loin pour la réalisation de cette étude*

*Au nom de Dieu le clément et le miséricordieux.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail :*

*A ma très chère mère Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Qu'ALLAH te protège et te donne la santé, le bonheur et longue vie.*

*A mon très cher père Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, Et ses encouragements. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de ma Profonde affection et tendresse. Qu'ALLAH le tout puissant te préserve, t'accorde Santé, bonheur et te protège de tout mal.*

*A toute ma famille*

*A tous mes amies*

*A toute ma promotion*

## SOMMAIRE

<b>Remerciements</b>	
<b>Liste des figures et tableaux</b>	
<b>RESUME</b>	
<b>INTRODUCTION</b>	<b>01</b>
<b>Chapitre I. Synthèse bibliographique</b>	<b>02</b>
<b>1. Les protéases végétales utilisées en coagulation du lait</b>	<b>02</b>
<b>1.1. Protéases végétales appartenant au groupe des protéases à aspartates</b>	<b>02</b>
<b>1.2. Protéases végétales appartenant au groupe protéases à Cystéine</b>	<b>03</b>
<b>1.3. Protéases végétales appartenant au groupe protéases à Sérine</b>	<b>03</b>
<b>2. La protéase végétale de la fleur de l'Artichaut</b>	<b>04</b>
<b>2.1. Description Botanique de l'artichaut</b>	<b>05</b>
<b>2.2. Classification et dénomination</b>	<b>06</b>
<b>2.3. Cycle de croissance naturel de l'artichaut</b>	<b>07</b>
<b>3. La coagulation enzymatique du lait</b>	<b>08</b>
<b>3.1. Rappels sur le lait</b>	<b>08</b>
<b>3.1.1. Définition</b>	<b>08</b>
<b>3.1.2. Composition du lait</b>	<b>09</b>
<b>3.1.2.1.L'eau</b>	<b>09</b>
<b>3.1.2.2.Le lactose</b>	<b>09</b>
<b>3.1.2.3.La matière grasse</b>	<b>09</b>
<b>3.1.2.4.Les matières azotées</b>	<b>09</b>
<b>3.1.2.4.1. Les caséines</b>	<b>09</b>

<b>3.1.2.5. Les matières azotées</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Processus de coagulation du lait</b>	<b>11</b>
<b>3.2.1. Mécanisme de la coagulation enzymatique du lait</b>	<b>12</b>
<b>4. Le fromage</b>	<b>14</b>
<b>4.1. Définition</b>	<b>14</b>
<b>4.2. Classification des fromages</b>	<b>15</b>
<b>4.2.1. Les fromages frais</b>	<b>15</b>
<b>4.2.2. Les fromages à pâte molle</b>	<b>15</b>
<b>4.2.3. Les fromages à pâte pressée</b>	<b>16</b>
<b>4.2.4. Les fromages à pâte persillée</b>	<b>17</b>
<b>4.2.5. Les fromages fondus</b>	<b>17</b>
<b>Chapitre II. Matériels et Méthodes</b>	<b>20</b>
<b>1. Matériel</b>	<b>20</b>
<b>1.1. Matériel végétal</b>	<b>20</b>
<b>1.2. Matériel de laboratoire</b>	<b>20</b>
<b>2. Méthodes</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Caractérisation de l'extrait protéolytique de la fleur d'artichaut</b>	<b>20</b>
<b>2.1.1. Mesure de l'activité coagulante de l'extrait de la fleur de l'artichaut</b>	<b>20</b>
<b>2.1.2. Mesure de la concentration en protéines de l'extrait de la fleur de l'artichaut</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Evaluation de l'aptitude fromagère de la protéase de la fleur d'artichaut</b>	<b>21</b>
<b>2.2.1. Origine du lait de vache</b>	<b>21</b>
<b>2.2.2. Essai de Fabrication de fromage à pâte molle</b>	<b>22</b>
<b>2.2.3. Analyses physico-chimique du lait, du lactosérum et du caillé</b>	<b>24</b>

<b>2.2.3.1. Le pH</b>	<b>24</b>
<b>2.2.3.2. L'acidité titrable</b>	<b>24</b>
<b>2.2.3.3. La densité</b>	<b>24</b>
<b>2.2.3.4. La matière sèche</b>	<b>25</b>
<b>2.2.3.5. La matière grasse</b>	<b>25</b>
<b>2.2.3.6. La teneur en protéines et en caséines</b>	<b>25</b>
<b>2.2.3.7. Les cendres</b>	<b>26</b>
<b>2.2.3.8. Le lactose</b>	<b>26</b>
<b>2.2.4. Evaluation de l'essai de fabrication de fromage</b>	<b>26</b>
<b>2.2.4.1. Bilan de fabrication</b>	<b>26</b>
<b>2.2.4.2. Rendements fromagers et coefficient de récupération</b>	<b>27</b>
<b>Chapitre III. Résultats et discussion</b>	<b>29</b>
<b>1. Le pouvoir coagulant de l'extrait protéolytique de la fleur de l'artichaut</b>	<b>29</b>
<b>2. Caractéristiques physico-chimiques du lait</b>	<b>29</b>
<b>3. Evaluation du comportement de la protéase d'artichaut en fabrication de fromage à pâte molle</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Bilan matière des deux micro-fabrications</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Coefficient de rétention et rendement fromager</b>	<b>31</b>
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>33</b>
<b>Références Bibliographiques</b>	

## Liste des tableaux et figures

<b>Figures / Tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>Numéro de page</b>
Figure 1.	Parties de la plante d'artichaut . <b>A.</b> Coupe transversale dans la fleure ; <b>B.</b> Fruit d'artichaut avec inflorescence verte. <b>C.</b> Pied d'artichaut. <b>D.</b> Inflorescence/Fleur	05
Figure 2.	Feuilles et tige d'artichaut.	06
Figure 3.	Cycle de croissance naturel de l'artichaut.	08
Figure 4.	Schéma récapitulatif du mécanisme de coagulation enzymatique	14
Figure 5.	Image de la ricotta	15
Figure 6.	Image du Camembert	16
Figure 7.	Image du Gruyer	17
Figure 8.	Image du Roquefort	17
Figure 9.	Image du fromage fondu en portion	18
Figure 10.	Classification didactique du fromage	18
Figure 11.	Diagramme de fabrication du fromage à pâte molle	23
Tableau 1.	Composition typique du lait de vache	11
Tableau 2.	Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache	30
Tableau 2.	Bilan matière de la transformation du lait de vache en fromage à pâte molle.	30
Tableau 3.	Caractéristiques de la fabrication de fromage à pâte molle.	31

## **RESUME**

Cette étude est consacrée à l'évaluation de l'aptitude fromagère de la protéase issue de la fleur de l'artichaut (*Cynara scolymus*). Elle est utilisée en fabrication d'un fromage à pâte molle comme alternative aux coagulants importés et plus particulièrement à la chymosine recombinante.

Dans ce travail, l'effet de l'incorporation de l'extrait de la fleur d'artichaut dans la fabrication de fromages de lait de vache à pâte molle est étudié. Deux micro-fabrications de six litres de lait chacun ont été transformés en fromages. Ces deux essais ont été coagulés, avec l'extrait de la fleur d'artichaut et de la chymosine recombinante de manière séparée. La composition chimique des laits et des caillés a été réalisé en vue de déterminer les bilans de fabrication et les rendements fromagers.

**Mots clés :** Protéase végétale, Artichaut, coagulation du lait, Fromage.

## ***INTRODUCTION***

---

## ***INTRODUCTION***

La coagulation du lait est une étape importante de la préparation du fromage. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé qui, après un certain nombre de transformations, deviendra un fromage.

Le processus de la coagulation est provoqué par l'action d'un coagulant, ajouté à un taux bien défini au lait de fabrication, lui-même à une température et un pH précis. Le coagulant le plus connu est la présure, qui est extraite de l'estomac du jeune veau nourri au lait. Toutefois, les fromages à base de coagulant végétal se rencontrent dans un bon nombre de pays de la Méditerranée. Ces pays, principalement l'Espagne et le Portugal, ont une riche tradition d'utilisation de protéases extraites du chardon dans la fabrication de fromages pâtes molles et pâtes pressées (**Roseiro et al. 2003**).

Ce sont les étamines du chardon (*Cynara cardunculus*), plante de la famille des Astéracées, comme l'artichaut, qui contiennent des cynarases qui font coaguler le lait. Elles sont récoltées sur les fleurs, puis séchées et broyées en une poudre, qui est ensuite trempée dans de l'eau pour en extraire les enzymes. Cette solution est utilisée pour faire cailler le lait dans les premières étapes du processus de la fabrication du fromage.

En Algérie et à l'instar des pays de méditerranée, il est traditionnellement fait état de l'emploi familial et artisanal du latex du figuier et de la fleur d'artichaut sauvage et alimentaire destinés à coaguler le lait.

L'étude de ces protéases d'origine végétale est d'une grande importance dans la mesure où elles pourraient constituer une alternative à l'emploi des coagulants importés en particulier la chymosine recombinante. D'autre part, leur utilisation permettra d'assurer une autonomie de l'industrie locale en matière d'approvisionnement en ces protéases coagulantes

L'objectif de ce travail est d'évaluer le comportement de la protéase de la fleur de l'artichaut en fabrication de fromage à pâte molle en comparaison à l'enzyme de référence : la chymosine.

***Chapitre I :***  
***Synthèse bibliographique***

---

## Chapitre I. Synthèse bibliographique

### 1. Les protéases végétales à action coagulante sur le lait

Les protéases végétales utilisées en coagulation du lait sont des enzymes protéolytiques qui interviennent, en fabrication fromagère, pour faire coaguler le lait via l'hydrolyse de la caséine  $\kappa$ . Elles appartiennent au groupe des protéases à cystéine mais également à la famille des protéases à sérine et des protéases à aspartyl antérieurement dénommées protéases acides.

Les protéases végétales utilisées en fromagerie comme agents coagulants sont des extraits aqueux obtenus à partir des différentes parties (fleurs, feuilles, tige) des plantes supérieures (**Garg et Johri, 1994**). La fleur de *Cynara cardunculus*, plante de la famille des Astéracées comme l'artichaut, est la plus fréquemment citée comme source potentielle de coagulant végétal (**Roseiro et al. 2003**).

Toutefois, la production industrielle des extraits coagulants végétaux se heurte à la variabilité de concentration de ces enzymes dans le fragment végétal utilisé en fonction des conditions d'obtention ou de culture : le climat, la nature du sol et l'âge de la plante.

Les protéases interviennent dans le cycle de vie des plantes. Elles sont mobilisées pour le stockage des protéines lors de la germination des graines, l'initiation du programme de mort cellulaire et de la sénescence (**Schaller 2004**). Les protéases sont classées en fonction de la nature du résidu du site actif impliqué dans le mécanisme catalytique du processus d'hydrolyse. Ces protéases végétales possédant un pouvoir coagulant appartiennent à la famille des Aspartyl, Sérine et cystéine protéases. Aucune des protéases étudiées ne s'est montrée comme une métallo-protéase (**Bruno et al. 2006**).

#### 1.1. Protéases végétales appartenant au groupe des protéases à aspartates

Les protéases aspartiques sont caractérisées par la présence de deux résidus aspartiques dans leur site catalytique. Elles sont actives à pH acide et ont une spécificité préférentielle pour les liaisons peptidiques se trouvant entre deux résidus d'acides aminés hydrophobes.

Le coagulant végétal le plus étudié de ce groupe de protéases aspartiques est l'extrait de chardon (*Cynara cardunculus*). Deux groupes de protéases ont été identifiés dans l'extrait enzymatique accumulé dans les fleurs mûres (pétales et pistils) du chardon. Il s'agit des cardosines et des cyprosines. La protéase la plus abondante est la cardosine A localisée dans les pistils (**Cordeiro et al. 1998**).

De plus, trois cyprosines ont été isolées, purifiées et caractérisées par **Heimgartner et al. (1990)**. Selon **Verissimo et al. (1996)**, les cardosines et les cyprosines présentent une action similaire à celle de la chymosine et la pepsine contenues dans la présure animale.

D'autres plantes appartenant au genre *Cynara* ont fait l'objet de recherche sur les protéases coagulantes. Une action coagulante sur le lait est observée par l'extrait de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) **Llorente et al. (1997)**, par l'extrait de chardon-Marie (*Silybum marianum* L. Gaertn.) (**Vairo-Cavalli et al. 2005**).

## **1.2. Protéases végétales appartenant au groupe protéases à Cystéine**

Les protéases à cystéine, également appelées protéases à thiol, sont des enzymes qui impliquent le groupe cystéine du site actif dans le mécanisme catalytique.

Le représentant typique de ce groupe de protéase est la ficine isolé du latex du figuier (*Ficus carica*). Cette enzyme possède une active coagulante dans une large gamme de pH (entre 4,5-10), néanmoins son emploi en coagulation du lait est limité à l'échelle artisanal en raison de son action protéolytique excessive.

Plus récemment, la littérature scientifique mentionne la présence de protéases dans l'extrait des graines de tournesol (**Egito et al. 2007**), des fruits mûrs du kiwi (*Actinidia chinensis*) (**Katsaros et al. 2010**), et des rhizomes de gingembre (*Zingiber officinale*) (**Hashim et al. 2011**).

## **1.3. Protéases végétales appartenant au groupe protéases à Sérine**

Les protéases à sérine, caractérisées par le résidu sérine de leur site catalytique, sont actives dans une gamme de pH comprise entre 7 et 11. Ce sont donc des protéases alcalines. Elles sont répandues dans les graines, les fleurs, les tiges, les feuilles et les racines de nombreux

arbres mais sont plus abondantes dans les fruits. Les séryl-protéases sont également retrouvées chez les légumineuses, les cucurbitacées, et les céréales (**Rawlings et Barrett 2004**).

Parmi les protéases à sérine décrites dans la littérature et ayant une activité coagulante, on notera la Cucumisine extraite des grains de melon (*Cucum ismelo*) (**Uchikoba et Kaneda 1996**) et la Streblin isolée à partir de *Streblus asper*. Cette dernière est une enzyme thermostable dont la masse moléculaire est de 63 kDa (**Tripathi et al. 2011**).

Enfin, il y a lieu de signaler que les extraits végétaux ayant un pouvoir coagulant sur le lait peuvent contenir des enzymes de différentes familles. C'est le cas de l'extrait de pulpe des fruits de *Balanites aegyptiaca* qui contient deux types de protéases, une protéase aspartique et une protéase à sérine. Ces deux enzymes présentent respectivement une activité optimale à pH 5,0 et pH 8,0 (**Beka et al. 2014**).

## **2. La protéase végétale de la fleur de l'Artichaut**

L'artichaut est une plante potagère de la famille des Astéracées, dont on consomme le bouton floral. Il est riche en fibres, minéraux, vitamine B9 et oligo-éléments. La fleur de l'artichaut cumule dans ses stigmates et pistils des protéases dont l'activité coagulante a été rapportée par **Verissimo et al. (1996)**.

Dans la tradition et en raison de la faible rentabilité de la récolte de la fin de la saison de printemps, les plantes d'artichaut sont laissées sur les champs à la sénescence, c'est à dire jusqu'au mois de juin. Les têtes d'artichaut sont cueillit et mises à sécher dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière. Les fleurs mûres et complètement séchées sont mises à macérer dans de l'eau jusqu'à ce que l'eau acquière la couleur brune. L'homogénat est filtré, les débris de fleur sont jetés et la solution enzymatique est utilisée comme coagulant.

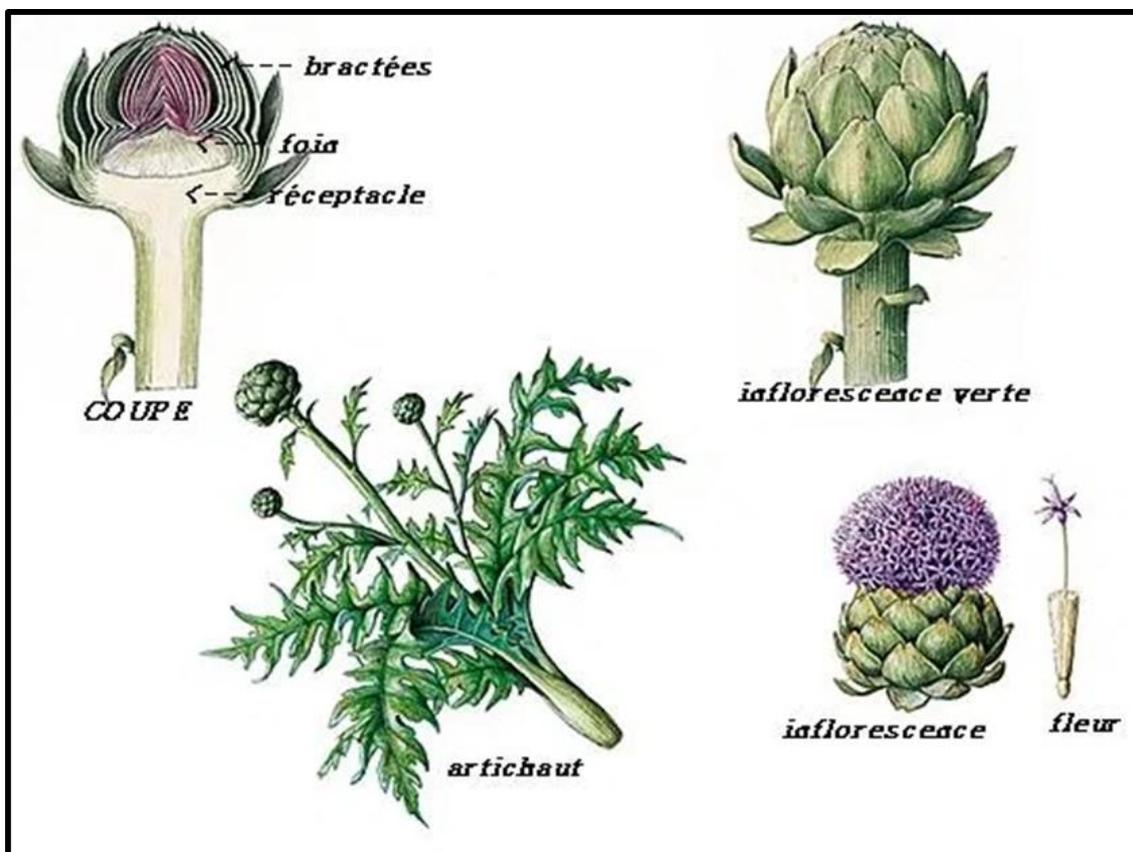
L'utilisation de ce coagulant reste toutefois restreinte à certaines régions géographiques, dans la péninsule Ibérique, où le coagulant issu du genre *Cynara* est utilisé pour la fabrication de fromages traditionnels. Il est particulièrement utilisé au Portugal dans la fabrication d'un fromage AOC, le « Serra da Estrela » un fromage à pâte molle fabriqué à partir de lait de brebis (**Grandy, 2015**).

L'usage limité des coagulants végétaux est souvent attribué aux défauts de texture et d'amertume qu'ils engendrent dans les produits fromagers largement commercialisés. La production industrielle des extraits coagulants végétaux se heurte à la variabilité de

concentration de ces enzymes dans le fragment végétal utilisé et qui est tributaire des conditions de culture : le climat, la nature du sol et l'âge de la plante.

## 2.1. Description de la plante d'artichaut

*Cynara scolymus*, est une plante du type vivace allant de 1m à 1,50 m de hauteur et caractérisé par un cycle productive qui dure 3 ou 4 ans. L'inflorescence (capitule ou tête) consiste en un pédoncule très long (jusqu'à 180 cm), un réceptacle où sont insérées des fleurs (Fig. 1 et 2) et des bractées externes. Les têtes sont récoltées aux premiers stades de leur développement et. Étant donné que seule la portion centrale est consommée, Ainsi, les feuilles, les bractées externes et les tiges rejetées par l'industrie de transformation des artichauts (Falco *et al*, 2015).



**Figure 1.** Parties de la plante d'artichaut . **A.** Coupe transversale dans la fleur ; **B.** Fruit d'artichaut avec inflorescence verte. **C.** Pied d'artichaut. **D.** Inflorescence/Fleur



**Figure 2.** Feuilles et tige d'artichaut.

L'artichaut est un légume couramment cultivé dans le sud de l'Europe, dans la région Méditerranéenne. En raison de ses exigences thermiques élevées, il est cultivé en Pologne comme plante annuelle. Dans les pays méditerranéens, l'artichaut est une plante herbacée vivace (Saáata *et al*, 2012).

## **2.2. Classification et dénomination**

Selon APG Classification, l'artichaut est classé comme suit :

### **Classification cladique :**

Uni : plantae.

Clade : Asterids

Clade : Euasteridi II

Ordre : Asterales.

Famille : Astéracées.

Tribu : Cynareae.

Nom binomial : *Cynara scolymus* L., 1753

## Classification taxonomique :

Embranchement : Phanérogames.

S/embranchement : Angiospermes.

Classe : Dicotylédones.

Ordre : Asterales.

Famille : Astéracées.

Genre : *Cynara*.

Espèce : *Cynara scolymus*.

## Synonymes :

- *Cynara hortensis* **Mill. 1768.**
- *Cynara esculenta* **Salisb, 1796.**
- *Cynara cardunculus* subsp. *scolymus* (L.) **Hegi, 1928.**
- *Cynara cardunculus* var. *sativa*. **Moris 1840-1843.**
- *Cynara scolymus* var. *mutica*. **Vis., 1847.**
- *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) **Fleurs 1904.**

### 2.3. Cycle de croissance naturel de l'artichaut

L'artichaut, comme d'autres espèces Méditerranéennes, est une plante entièrement adaptée aux conditions climatiques locales. La première étape du cycle de croissance de l'artichaut commence après la germination des graines, généralement dans les premières semaines de l'automne. À ce stade, deux cotylédons frais surgissent du sol, suivis de plusieurs feuilles, plus tard, d'une rosette de feuilles. À la fin du printemps, se développe un scape floral ramifié de feuilles comprenant plusieurs têtes (Fig.3). Après la pleine floraison et la fertilisation des fleurs, les fruits mûrissent et enfin la biomasse aérienne s'assèche en été. Le processus de récolte doit être effectué après la fin du cycle de croissance des plantes, mais avant la dispersion des graines (Conceição *et al*, 2018).

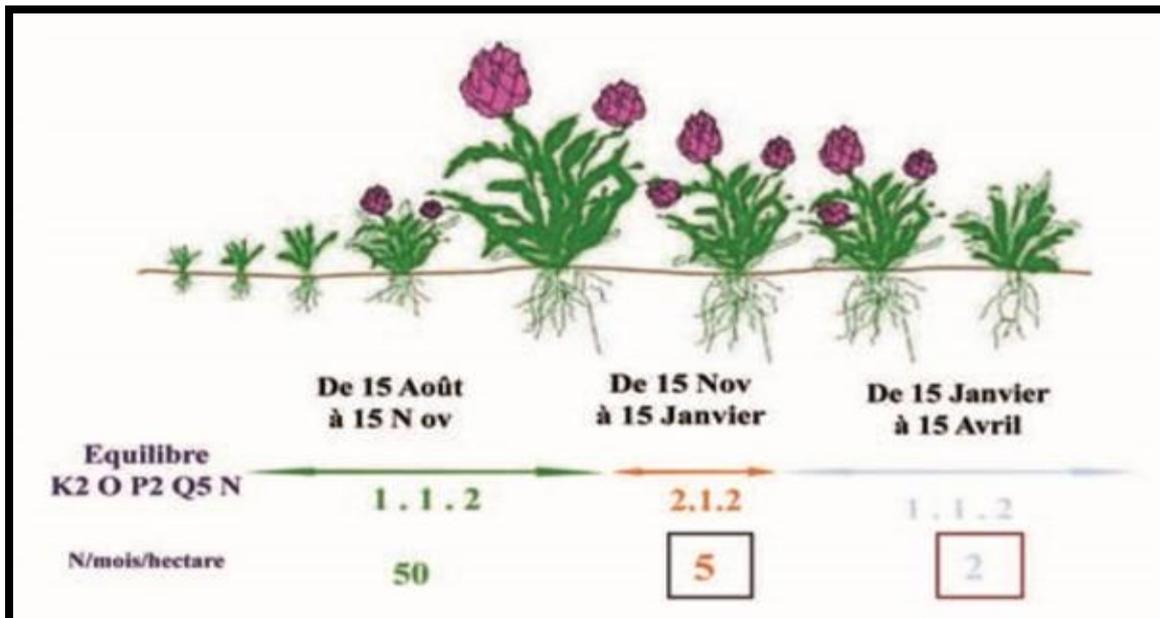


Figure 3. Cycle de croissance naturel de l'artichaut.

### 3. La coagulation enzymatique du lait

#### 3.1. Rappels sur le lait

##### 3.1.1. Définition

Le lait, principale matière première employée dans la fabrication fromagère, a été défini en 1909 par le congrès international de la répression des fraudes (Boudier et Luquet, 1981) comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée, il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum».

Le lait est un mélange liquide complexe de substances dont les plus abondantes sont : l'eau, le lactose, la matière grasse, les protéines et les sels (Mathieu, 1998.). Le lait présente une grande variabilité dans sa composition selon l'espèce animale, la race, l'individu, le stade de lactation (Mietton et al, 1994).

##### 3.1.2. Composition du lait

###### 3.1.2.1. L'eau

C'est le composant le plus abondant. Elle constitue la phase dispersante des éléments hydrosolubles du lait (**Mathieu, 1998**).

### **3.1.2.2. Le lactose**

Le lactose est le constituant majeur de la matière sèche. Il est à l'état soluble et, au cours de l'égouttage du fromage, il est en grande partie éliminé avec le lactosérum (**Mietton et al, 1994**).

### **3.1.2.3. La matière grasse**

La matière grasse se présente sous forme de globules sphériques au nombre de  $1,5$  à  $4,6 \times 10^{12}$  par litre, leur diamètre moyen se situe entre  $3$  et  $5 \mu\text{m}$ . Cette matière grasse se répartie en deux fractions : une fraction lipidique représentant  $99,5\%$  de l'ensemble, et une fraction insaponifiable (**Paccalin et Galentier, 1985**).

Les laits des petits ruminants (chèvre et brebis) sont beaucoup plus riches en acide gras à courte chaîne ( $C_4$  à  $C_{12}$ ) que le lait de vache ( $20\%$  contre  $13\%$ ). Ces particularités expliquent qu'après affinage, le fromage à base de lait de chèvre ou de brebis présente des arômes particuliers liés à la libération rapide de ces acides gras à courte chaîne par lipolyse (**Mietton et al, 1994**).

### **3.1.2.4. Les matières azotées**

Les matières azotées totales du lait sont représentées par les caséines ( $\alpha$ ,  $k$ , et  $\delta$ ), les protéines solubles ou sériques ( $\beta$  - Lactoglobuline,  $\alpha$  - Lactalbumine, sérum albumine, immunoglobuline et protéases - peptones) ; et les matières azotées non protéiques (urée, Acides aminés libres, créatine, ammoniac...).

Les deux dernières fractions ne flocculent pas en présence d'enzyme coagulante ou d'acide et sont donc éliminées avec le lactosérum

#### **3.1.2.4.1. Les caséines**

Les caséines sont présentes dans le lait sous forme de particules sphériques complexes, le plus souvent de  $20$  à  $300\text{nm}$  de diamètre, les micelles (**Goursaud, 1999**).

Ces dernières sont formées par l'association des caséines ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $k$ ), de quelques fragments peptidiques (les caséines  $\delta$ ) issus de la protéolyse de la caséine  $\beta$  par la plasmine, et de composants salins dont les deux principaux sont le calcium et le phosphate (**Brûle et Lenoir, 1987 ; Brûle et al 1997**).

L'agencement et le mode d'association de ces différents constituants restent controversés. Pour certains auteurs, la structure de la micelle résulte d'une association complexe de sous unités qualifiées de submicelles de nature exclusivement protéique et de composition variable, associées les unes aux autres par des éléments minéraux (**Schmidt, 1980**). Pour d'autres, la micelle doit être considérée comme une structure (supra moléculaire dont la partie périphérique formée essentiellement par la caséine k. (**Holt, 1997**). Toutefois, les modèles proposés s'accordent que la caséine k exerce un rôle de colloïde protecteur qui assure la stabilité de la micelle (**Mietton et al, 1994**).

Par ailleurs, la caséine k se distingue des autres protéines par sa sensibilité aux enzymes coagulantes. Sous leurs actions, elle libère une fraction peptidique appelée casino macro peptide, et l'ensemble des micelles de caséines est déstabilisé induisant ainsi, la coagulation du lait. C'est cette propriété qui est exploitée pour la fabrication du fromage.

Tous les laits n'ont pas la même aptitude à la transformation en fromage parce qu'ils sont plus au moins riches en protéines coagulables (**Mietton et al, 1994**).

#### **4.1.2.5. Les matières minérales**

Les matières minérales rassemblent divers constituants se trouvant dans le lait à l'état d'ions ou de sels non dissociés. Elles sont pour une partie à l'état dissoutes et pour une autre sous forme colloïdale. Entre ces deux formes, il existe un état d'équilibre qui constitue à la stabilité des micelles (**Mietton et al, 1994**). Cet état d'équilibre est soumis à l'influence de plusieurs facteurs parmi lesquels pH et température, dont la vaporisation provoque un fond remaniement de répartition des constituants salins du lait entre ses différentes phases. Ces changements de répartition entre ces divers constituants influencent le comportement du lait lors des traitements et transformations (**Mathieu, 1998**).

**Tableau 1.** Composition typique du lait de vache (d'après ALAIS, 1984)

<b>Constituants</b>	<b>Concentration (en g/l)</b>
Eau	<b>905</b>
Glucides : lactose	<b>49</b>
Lipides :	<b>35</b>
Matières grasses	<b>34,0</b>
Lécithine (phospholipides)	<b>0,5</b>
Partie insaponifiable (stérol, carotènes, tocophérols)	<b>0,5</b>
Protides :	<b>34</b>
Caséine	<b>27,0</b>
Protéines « solubles » (globulines, albumines)	<b>5,5</b>
Substances azotées non-protéiques	<b>1,5</b>
Sels	<b>9</b>
de l'acide citrique (en acide)	<b>2,0</b>
de l'acide phosphorique (PO)	<b>2,6</b>
de l'acide chlorhydrique (NaCl)	<b>1,7</b>
Constituants divers	<b>traces</b>
(vitamines, enzymes, gaz dissous)	
Extrait sec (total)	<b>127</b>
Extrait sec non gras	<b>92,0</b>

### **3.2. Processus de coagulation du lait**

La fabrication d'un fromage, selon les procédés classiques, se déroule en trois étapes principales (Mietton *et al.*, 1994).

- La coagulation du lait avec formation du gel ou coagulum : le réseau protéique de caséines retient la matière grasse et la phase aqueuse (le lactosérum). Cette coagulation est réalisée par la combinaison de l'action des enzymes coagulantes contenues dans la présure (c'est la voie enzymatique) et des bactéries lactiques contaminant à l'état naturel le lait ou apportées sous forme de levains (c'est la voie fermentaire). L'importance

relative de ces deux principes (voies) détermine les propriétés du caillé obtenu et en conséquence l'intensité de l'égouttage, l'affinage et la taille du fromage.

- L'égouttage du gel conduisant à la formation du caillé ou caillebotte : le réseau protéique est concentré suite à l'expulsion spontanée du lactosérum par synérèse (contraction du gel de caillé). L'égouttage, réalisé sous presse, est associé à l'opération de moulage qui donne la forme au fromage.
- L'affinage du caillé : la matrice caséique subit une maturation enzymatique (présure et microflore lactique) qui impacte la texture et la saveur du fromage.

### 3.2.1. Mécanisme de la coagulation enzymatique du lait

Le mécanisme d'action des enzymes coagulantes lors de la coagulation du lait est bien établi. Il comporte deux phases (Claverie-Martín et Vega-Hernández, 2007) :

**Une phase primaire dite enzymatique** qui correspond à la réaction d'hydrolyse proprement dite de la fraction caséine  $\kappa$  au niveau de la liaison peptidique Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>. Cette hydrolyse libère le glycomacropéptide qui est la partie 106-169 à caractère hydrophile, chargée négativement et responsable des répulsions électrostatiques.

La partie qui reste intégrée à la micelle (1-105), c'est la partie N-terminal à caractère hydrophobe désignée paracaséine- $\kappa$ . La perte du pôle le plus hydraté des micelles induit une diminution importante de la charge nette négative des micelles et les répulsions électrostatiques sont amoindries. Il s'ensuit une diminution sensible de l'enveloppe d'hydratation car les possibilités de fixation d'eau à la surface des micelles se trouvent fortement limitées.

La réaction d'hydrolyse enzymatique est dépendante de nombreux facteurs physicochimiques : la concentration en enzymes, la température et le pH.

**La phase secondaire, dite d'agglomération**, se caractérise par l'agrégation puis la réticulation des micelles déstabilisées qui ont perdu leur capacité de répulsion à la suite de la scission de la partie hydrophile de la caséine  $\kappa$ . Cette phase d'agglomération débute lorsqu'au moins 80% de la caséine  $\kappa$  est hydrolysée.

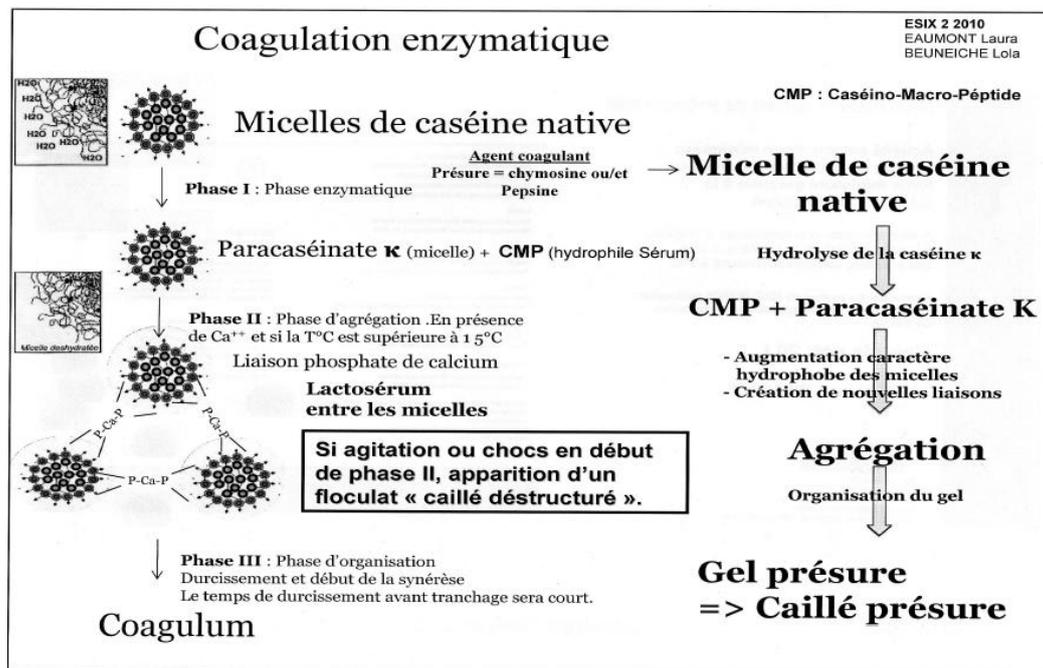
Les paracaséines vont se lier entre elles par des liaisons hydrophobes, ce qui crée la coagulation (Risso *et al.*, 2007). Elle commence d'abord par l'agrégation des petites micelles, puis se

complète par l'agrégation des grosses micelles pour former le gel de para-caséine. Il s'en suit une structuration tridimensionnelle des micelles de caséines superficiellement déshydratées.

Les ions calcium s'uniraient à la partie chargée négativement des micelles, diminuant ainsi les répulsions électrostatiques auxquelles elles sont soumises et favoriseraient la formation des ponts phosphocalciques entre les paracaséines.

Les ponts d'accrochages ne sont pas répartis uniformément à la surface des micelles mais sont localisés, formant des chaînes isolant des vacuoles contenant du lactosérum. Un gel beaucoup plus ferme, très poreux et très minéralisé en résultera, se créant dans les trois dimensions de l'espace en retenant la phase aqueuse et la matière grasse dans ces mailles (**Lucey et al., 2000**). La présence du calcium soluble à l'état ionisé est indispensable à l'accomplissement de cette phase.

Par ailleurs, cette phase secondaire de floculation est très sensible aux variations de température. En effet, l'augmentation de la température diminue fortement le temps d'agrégation alors qu'au-dessous de 10°C, l'agrégation des micelles de caséines même totalement dépourvues de la partie C-terminale de la caséine  $\kappa$  ne se produit pas. Dans la pratique, l'augmentation de la température va jouer sur l'établissement des liaisons au sein du caillé et un accroissement significatif de la contraction du grain et de l'expulsion de sérum (**Vétier et al., 2003**).



**Figure 4.** Schéma récapitulatif du mécanisme de coagulation enzymatique

## **4. Le fromage**

### **4.1. Définition**

La dénomination « fromage » est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse (MG), babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse. La teneur minimale en matière sèche (MS) du produit ainsi défini doit être de 23 g pour 100 g de fromage.

Le fromage est obtenu par coagulation des protéines du lait, du lait écrémé, du lait partiellement écrémé, de la crème, de la crème de lactosérum ou du babeurre, seuls ou en combinaison, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation, tout en respectant le principe selon lequel la fabrication du fromage entraîne la concentration des protéines du lait (notamment de la caséine). La teneur en protéines du fromage étant par conséquent nettement plus élevée que la teneur en protéines du mélange des matières premières ci-dessus qui ont servi à la fabrication du fromage

### **4.2. Classification des fromages**

Les fromages sont généralement classés selon leur fermeté, qui varie suivant le degré d'humidité. Les pâtes dures contiennent aussi peu que 30 % d'humidité tandis que les pâtes molles ou fraîches peuvent en contenir jusqu'à 80 %. On trouve donc les fromages frais (ou non affinés), les fromages affinés à pâte molle, à pâte ferme et demi-ferme (ou pâte pressée), à pâte persillée, les fromages fondus et les fromages de chèvre.

#### **4.2.1. Les fromages frais**

Les fromages frais (non affinés) ont coagulé sous l'action des ferments lactiques et non par l'ajout de présure. Ils sont uniquement égouttés. Ils ne sont pas vieillis et doivent être consommés rapidement. Cette catégorie inclut : le fromage cottage, la ricotta, le mascarpone, le fromage à la crème, et le quark.

On les utilise principalement en pâtisserie et dans des entremets, nature ou assaisonnés de légumes, de fruits ou d'épices.



**Figure 5.** Image de la ricotta

#### **4.2.2. Les fromages à pâte molle**

Les fromages à pâte molle sont affinés durant une période relativement courte, égouttés et moulés, mais non pressés et non cuits. Leur taux d'humidité varie entre 50 et 60 % et les matières grasses représentent de 20 à 26% du poids du fromage. Ils ont une croûte plus ou moins veloutée et sont surtout mangés tels quels, avec du pain, car ils perdent beaucoup de saveur lorsqu'ils sont chauffés.

Les fromages à pâte molle se répartissent en deux catégories définies par l'aspect de la croûte : les fromages à croûte fleurie (recouverts d'une mince couche de duvet blanc ou moisissure) comme le camembert, le brie et le coulommiers, et les fromages à croûte lavée (par une saumure légère qui aide à maintenir l'humidité et la souplesse de la pâte et de la croûte) comme le munster, le pont-l'évêque ou l'époisses.

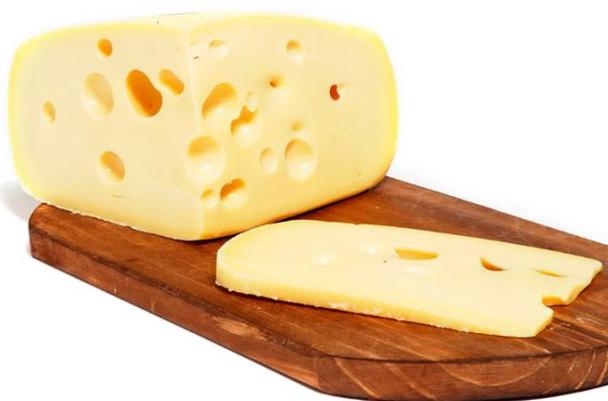


**Figure 6.** Image du Camembert

### **4.2.3. Les fromages à pâte pressée**

Les fromages à pâte pressée sont répartis en deux catégories : les pâtes demi-fermes et les pâtes fermes. La pâte des fromages demi-fermes est pressée mais non cuite, ce qui leur donne une consistance dense et une couleur jaune pâle. Parmi eux, on trouve le cheddar, le cantal, le reblochon, l'édam et le gouda.

La pâte des fromages fermes est pressée et cuite, c'est-à-dire que le caillé est chauffé pendant moins d'une heure afin de l'affermir. Le résultat est une pâte compacte ornée parfois d'une croûte résistante et dont la texture peut être très granuleuse comme dans le cas du parmesan et du romano. Le gruyère, l'emmenthal, la raclette et le beaufort font également partie de cette catégorie.



**Figure 7.** Image du Gruyer

### **4.2.4. Les fromages à pâte persillée**

Les fromages à pâte persillée sont aussi appelés «bleus». Ce sont des fromages ni cuits ni pressés dont le caillé estensemencé de moisissures déposées dans la pâte à l'aide de longues aiguilles, pour obtenir une fermentation s'effectuant de l'intérieur vers l'extérieur. Ces fromages, comme le roquefort, le gorgonzola, le stilton, le bleu de Bresse ou le bleu danois, ont un goût poivré, fort et piquant et leur texture est habituellement friable.



**Figure 8.** Image du Roquefort

#### **4.2.5. Les fromages fondus**

Les fromages fondus (à pâtes recuites) sont des fromages fabriqués à partir d'un ou de plusieurs fromages à pâte pressée, cuite ou non, refondus, additionnés de lait, crème ou beurre; ces fromages ont l'avantage de se conserver longtemps. On ajoute à la pâte, selon le produit, des agents stabilisateurs, des émulsifiants, du sel, des colorants, des édulcorants (sucre, sirop de maïs) et des assaisonnements (herbes, épices, fruits, noix, kirsch). On obtient une texture plus ou moins molle et élastique et une saveur peu prononcée. En Amérique du Nord, ces fromages sont surtout faits à base de cheddar tandis qu'en Europe l'emmental et le gruyère prédominent.



**Figure 9.** Image du fromage fondu en portion

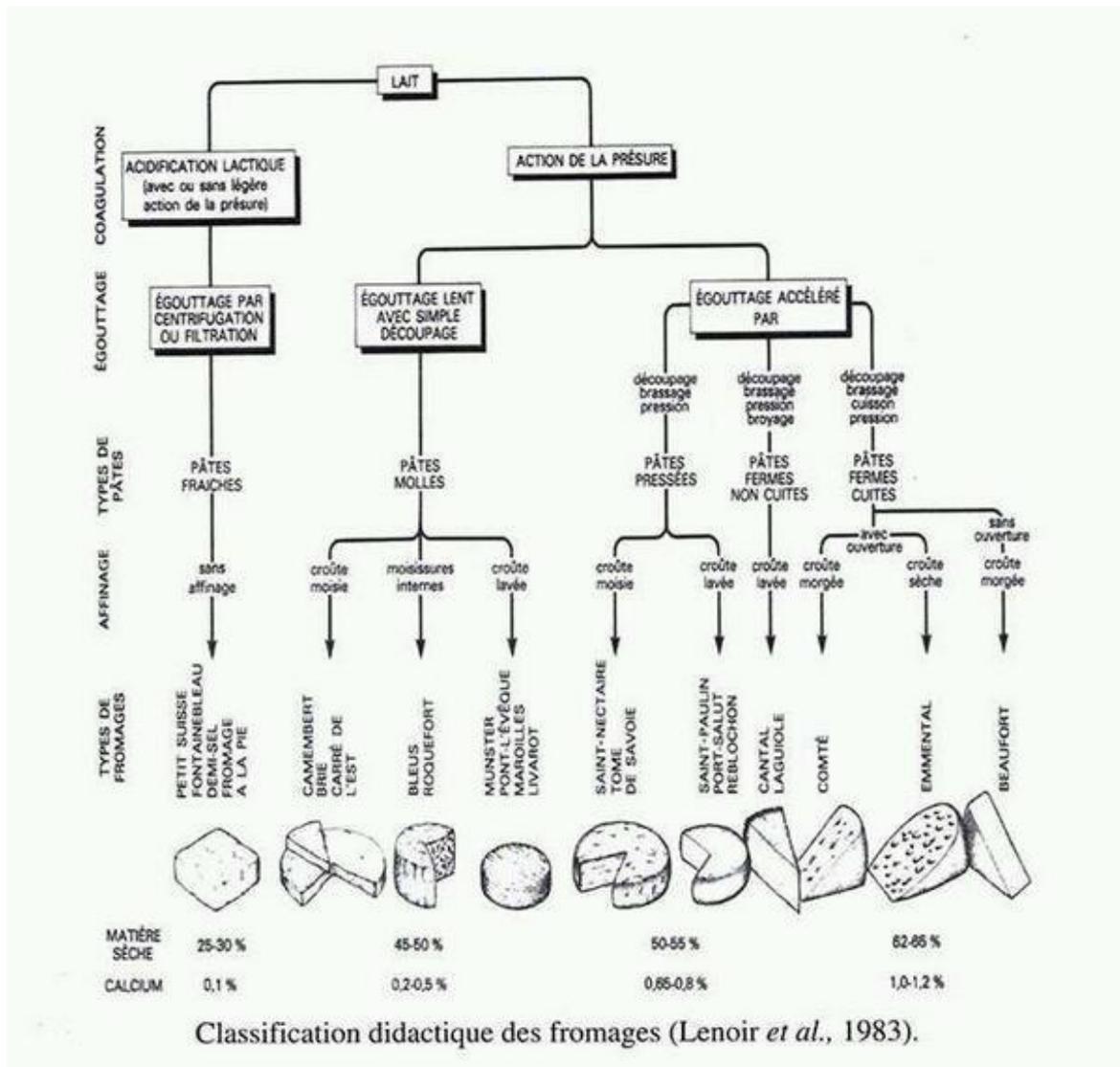


Figure 10. Classification des fromages

*Chapitre II :*  
*Matériel et Méthodes*

---

## **Chapitre II. Matériel et méthodes**

Le but de ce travail consiste à évaluer l'aptitude fromagère d'une protéase végétale qui l'extrait de la fleur de l'artichaut. Notre expérimentation a été réalisée au niveau de l'atelier fromager de l'Institut Technique de l'Élevage (ITELV) de Baba Ali, Alger.

### **1. Matériel**

#### **1.1. Matériel végétal**

Les artichauts sont obtenus auprès d'une exploitation agricole située au niveau de la région de Rouïba (Hrissa). Ils ont été récoltés en mai 2020. Les fleurs mûres (pétales et pistils) sont séchées à l'ombre dans un endroit aéré, puis broyées pour les réduire à l'état de poudre à l'aide d'un Blender.

Afin de faciliter le passage de cette protéine en solution, le broyat des fleurs préalablement séchées et broyées sont mises à macérer dans une solution aqueuse sous des conditions douces qui permettent d'éviter la dénaturation des protéines enzymatiques selon le protocole décrit par Sanjuán *et al.* (2002).

L'homogénat obtenu est ensuite clarifié par filtration pour éliminer les grosses particules. Le surnageant contenant les protéines enzymatiques est récupéré en vue de son utilisation

#### **1.2. Matériel de laboratoire**

C'est le matériel de laboratoire qui englobe les réactifs chimiques et l'appareillage de laboratoire (**Annexe**).

### **2. Méthodes d'analyses**

#### **2.1. Caractérisation de l'extrait protéolytique de la fleur d'artichaut**

##### **2.1.1. Mesure de l'activité coagulante de l'extrait de la fleur de l'artichaut**

L'activité coagulante de l'extrait enzymatique est mesurée par la méthode de **Berridge (1952)**, utilisant un lait reconstitué standard.

Le substrat standard est un lait en poudre reconstitué avec une solution de chlorure de calcium, à raison de 12 g de poudre de lait écrémé de type basse température, solubilisés à l'aide d'un

agitateur magnétique pendant 30 min, dans 100 ml de solution de  $\text{CaCl}_2$ , 0,01 M. Ce substrat dont le pH est ajusté à 6.5, est placé dans un Bain-Marie régulé à 30 °C pendant 30 min avant les mesures.

Le principe de la mesure repose sur la détermination, à 32 °C, du temps de coagulation qui est l'intervalle séparant l'ajout de 1 ml d'extrait enzymatique à 10 ml de lait et l'apparition des premiers flocons de caillé de lait sur la paroi du tube mis en rotation.

Une unité d'activité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour former un caillé en 10 min dans les conditions décrites précédemment. L'activité coagulante est exprimée en unité de coagulation du lait (MCU/ml).

### **2.1.2. Mesure de la concentration en protéines de l'extrait de la fleur de l'artichaut**

La quantité totale de protéines des extraits enzymatiques (fractions brute et purifiées obtenues après chaque étape de purification), est estimée par la méthode de **Lowry et al. (1951)**. Il s'agit d'un dosage colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant le sérum albumine bovine (BSA) comme standard.

Le principe de la méthode de Lowry (1951) repose sur la réaction du réactif de Folin-ciocalteu avec les acides aminés aromatiques présents dans les protéines. L'absorbance du produit coloré est déterminée à 750 nm. La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de BSA (Sigma Aldrich) avec des concentrations comprises entre 0 et 500 µg/ml.

## **2.2. Evaluation de l'aptitude fromagère de la protéase de la fleur d'artichaut**

### **2.2.1. Origine du lait de vache**

L'échantillon de lait de vache de petit mélange de la traite mécanique du matin d'animaux sains en début de lactation, a été collecté auprès de la station expérimentale de l'Institut Technique de l'Élevage (ITELV de Baba Ali, Alger). Le prélèvement est transporté à l'atelier fromager où va se dérouler l'essai de fabrication de fromage à pâte molle. Un échantillon de 250 ml de lait a été fractionné afin de déterminer les caractéristiques physico-chimiques du lait.

## **2.2.2. Essai de Fabrication de fromage à pâte molle**

Un essai de fromage à pâte molle au lait de vache entier a été réalisé. Le lait est coagulé avec l'extrait coagulant de la fleur d'artichaut contenant les « cynarases », préalablement préparé. En parallèle, un fromage témoin est élaboré avec du lait emprésuré avec de la chymosine commerciale.

Les fromages ont été réalisés suivant le diagramme de fabrication présenté ci-dessous (Fig.4).

### **Etape 1 : Le traitement préparatoire du lait**

Le lait frais est chauffé à 72 °C pendant 15 secondes ou à 63 °C pendant 30 minutes pour détruire les bactéries pathogènes. On y ajoute ensuite un levain lactique qui permet d'acidifier légèrement le lait

### **Etape 2 : La transformation en fromage**

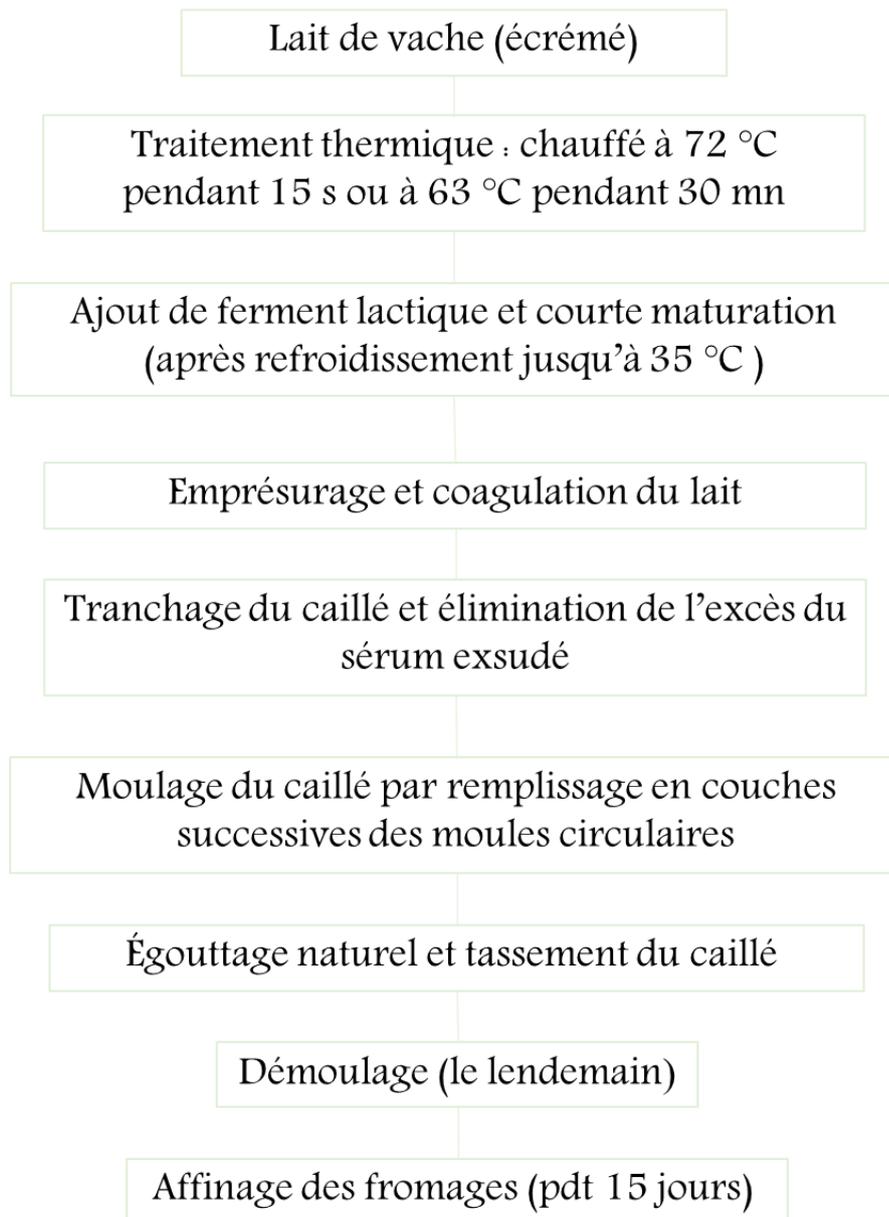
L'emprésurage du lait provoque son caillage, soit la coagulation de la caséine sous forme d'une pâte gélatineuse séparée du petit-lait. Ce caillé est prélevé, tranché et déposé dans des moules circulaires aux dimensions du futur fromage.

L'égouttage naturel permet le tassement du caillé entre chaque passage et se prolonge durant quelques heures. Les camemberts sont alors retournés et recouverts d'une plaque métallique qui agit comme une presse légère. Le démoulage a lieu le lendemain.

### **Etape 3 : L'affinage du fromage**

Le salage uniforme des fromages au sel fin joue un rôle dans leur conservation et le développement de leurs saveurs. Il est couplé à un ensemencement avec *Penicillium candidum* (ou *camembertii*), à l'origine de la moisissure blanche duveteuse qui va se développer à la surface du camembert et le protéger des contaminants extérieurs. L'affinage s'effectue ensuite en hâloir entre 10 et 18 °C, pendant une durée de 13 à 15 jours. Au cours de ce séjour en environnement régulé, les ferments lactiques initient un phénomène de protéolyse qui confère au fromage son onctuosité et ses propriétés gustatives particulières.

Des échantillons sont prélevés le jour même afin de les analyser sur le plan physicochimique (pH, EST, Cendres, protéines, MG), afin d'établir le bilan matière de chaque fabrication et de calculer les rendements fromagers.



**Figure 11.** Diagramme de fabrication du fromage à pâte molle

### **2.2.3. Analyses physico-chimique du lait, du lactosérum et du caillé (AFNOR, 1980)**

#### **2.2.3.1. Le pH**

Le pH du lait est mesuré à 20°C à l'aide d'un pH mètre HI 9025 (Hanna Instruments, Vila do Code, Portugal).

#### **2.2.3.2. L'acidité titrable**

L'acidité du lait est déterminée par titrage de l'acidité par l'hydroxyde de sodium (N/9) en présence de phénolphtaléine comme indicateur.

Un échantillon de 10 ml de lait est placé dans un bécher de 100 ml en présence de deux gouttes phénolphtaléine. La soude est ajoutée à la burette jusqu'au début de virage au rose de l'échantillon.

L'acidité est donnée par lecture directe de la chute de burette (nombre de ml de soude versée) et elle est exprimée en degré Dornic.

#### **2.2.3.3. La densité**

La densité du lait est définie comme le quotient de la masse d'un volume de lait sur le même volume d'eau, à 20 °C.

Elle est déterminée à l'aide d'un lactodensimètre qu'on introduit dans une éprouvette de 250 ml remplie de lait.

La densité est donnée par lecture directe de la graduation. Si la température du lait au moment de la mesure est supérieure ou inférieure à 20 °C, une correction de la lecture doit être faite de la façon suivante :

- ❖ Si la température est supérieure à 20 °C, augmenter la valeur de la densité lue de 0.2 par degré de au-dessus de 20 °C.
- ❖ Si la température est inférieure à 20 °C, diminuer la valeur de la densité lue de 0.2 par degré de au-dessous de 20 °C.

#### **2.2.3.4. La matière sèche**

La détermination de la matière sèche est basée sur la dessiccation par évaporation d'une quantité de produit (2.5 g de lait / lactosérum, 1.5 g de caillé) jusqu'à obtention d'une masse constante. La dessiccation est réalisée à l'aide d'un dessiccateur automatique muni d'une balance intégré, réglé à une température de 90°C et à une humidité de 100%.

Le résultat s'affiche après un bip sonore indiquant la fin de la mesure. Il est exprimé en pourcent en masse (g/100g).

#### **2.2.3.5. La matière grasse (le taux butyreux)**

Le taux butyreux est déterminé par la méthode acido-butyrométrique (méthode Gerber). Elle consiste en la séparation de la matière grasse de l'échantillon (11 ml de lait / lactosérum, 3 g de fromage ou de caillé) par centrifugation dans un butyromètre approprié (butyromètre Gerber pour le lait et le sérum, butyromètre de Van Gulik pour le fromage ou caillé) obtenu après dissolution des protéines par l'acide sulfurique. La séparation étant favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool amylique.

La teneur en matière grasse (exprimée en g/kg ou en g/l) obtenue par lecture directe de la différence de niveaux atteints par la couche de matière grasse sur l'échelle du butyromètre.

#### **2.2.3.6. La teneur en protéines totales et en caséines**

Les dosages des protéines, de caséines et des protéines sériques du lait ont été effectués selon les conditions décrites par **Remeuf *et al.* (1989)**.

La teneur en azote total (AT), en azote soluble (AS) a été déterminée par la méthode Kjeldahl (AFNOR, 1980) dont le principe consiste à transformer l'azote organique contenu dans l'échantillon en azote minéral (ammoniac), par minéralisation à 400 °C des échantillons, suivi d'une distillation à la vapeur.

Les différentes fractions azotées étaient préparées selon le protocole préconisé par Rowland (1938). Les teneurs en protéines et caséines, exprimées en g de protéines par litre de lait, sont calculées à partir des valeurs en azote protéique (AT) et azote caséique (AT-AS) corrigées par le facteur de conversion 6,38.

### 2.2.3.7. Les Cendres

On entend par cendres du lait (du sérum, du caillé), le produit résultant de l'incinération de la matière sèche du lait par chauffage dans un four à moufle à 530 °C ± 20°C jusqu'à disparition des particules charbonneuses.

Environ 2,5 g de caillé ou 10 ml de liquide (lait ou lactosérum) étaient pesés dans des creusets en porcelaine préalablement séchés à l'étuve à 150°C pendant 30 min. La masse des creusets vide était notée  $m_0$  et celle des creusets contenant les échantillons  $m_1$ .

Les creusets étaient ensuite placés à l'étuve à 150 °C pendant une nuit puis minéralisés au four à 550 °C pendant 5 h et refroidis dans des dessiccateurs à température ambiante. La masse des coupelles contenant les cendres était notée  $m_2$ . La teneur en cendres des échantillons était calculée sur la base de la formule :

$$\text{Teneur en cendres} = (M_2 - M_0) / (M_1 - M_0) \times 100$$

### 2.2.3.8. La teneur en lactose

Le lactose contenu dans le lait est déterminé par un appareil de dosage par absorption dans le moyen infrarouge. Une quantité de lait de 10 ml est placée dans une cellule de mesure puis analysé au moyen d'une unité optique.

## 2.2.4. Evaluation de l'essai de fabrication de fromage

### 2.2.4.1. Bilan de fabrication

Lors de la fabrication fromagère, le bilan matière est utilisé pour vérifier l'efficacité du procédé de fabrication et la répartition des matières à l'issue des fabrications. Il permet d'estimer les pertes de matière qui sont liés à la qualité du lait. Il égale à :

$$\text{Matière brute (\%)} = \text{Entrée (poids L)} - \text{Sorties (poids C + poids S)}$$

Avec : Poids  $L$  (%) : poids du lait

Poids  $c$  (%) : poids du caillé

Poids  $s$  (%) : poids du lactosérum

Le bilan des constituants du lait se calcule suivant la formule suivante :

$$\text{Bilan X} = \text{Ecart (bilan sortie - entrée de X)} \times 100 / \text{teneur globale (X en kg)}$$

#### 2.2.4.2. Rendements fromagers et coefficient de récupération

Les rendements de fabrication (rendements en frais (RFf) et en matière sèche (RFs) et les coefficients de récupération de matière (Cr) étaient calculés à partir des données de suivi de fabrication et des résultats des analyses physico-chimiques réalisées sur les laits de fabrication et les caillés et lactosérums obtenus à l'issue des fabrications.

Le RFf du fromage frais correspond au rapport de la masse du caillé obtenu ( $m$  caillé) après égouttage sur la masse de lait ( $m$  lait) mise en œuvre dans la fabrication.

Le rendement fromager en frais du fromage Edam correspond au rapport de la masse du caillé obtenu ( $m$  caillé) après pressage sur la masse de lait ( $m$  lait) mise en œuvre dans la fabrication.

Il est exprimé en pourcentage :

$$\text{RFf} = m \text{ caillé (kg)} / m \text{ lait (kg)} \times 100$$

Le rendement fromager en matière sèche (RFs) prend en compte les teneurs en EST du lait, caillé et lactosérum.

Il est également exprimé en pourcentage ;

$$\text{RFs} = [\text{EST lait (g/kg)} - \text{EST lactosérum (g/kg)} / \text{EST caillé (g/kg)} - \text{EST lactosérum (g/kg)}] \times 100$$

Le coefficient de rétention (Cr) d'un élément correspond au rapport de la masse de l'élément dans le caillé sur la masse de l'élément dans le lait. Il est exprimé en pourcentage.

Soit A l'élément considéré :

$$\text{Cr} = [\text{Teneur en A dans le caillé (g/kg)} \times m \text{ caillé (g/kg)} / \text{Teneur en A dans le lait (g/kg)} \times m \text{ lait (g/kg)}] \times 100$$

$$\text{Cr} = \text{MG f} \times \text{Q f} / \text{MG l} \times \text{Q l (g/kg)}$$

L'humidité du fromage dégraissé (HFD) peut également être calculée pour apprécier la disponibilité de l'eau dans les caillés et caractériser les fabrications du point de vue technologique.

Il est exprimé en pourcentage :

$$\text{HFD} = 100 - \text{EST du fromage (\%)} / 100 - \text{MG du fromage (\%)} \times 100$$

## ***Chapitre III :***

### ***Résultats et Discussion***

---

### III. Résultats et discussions

#### 1. Le pouvoir coagulant de l'extrait protéolytique de la fleur de l'artichaut

L'extrait de la fleur d'artichaut obtenu par macération d'un gramme de stigmates broyées dans 10 g d'eau distillé, à température ambiante pendant 24 heures, montre un pouvoir coagulant sur le lait (temps de coagulation < 2 min). L'activité coagulante est de 1.1 MCU/ml pour une concentration en protéine de 12 mg/ml. L'activité spécifique est en conséquence de 0.09MCU/mg. Ce résultat obtenu selon nos conditions opératoires est comparable à celui rapporté par Llorente et al. (2014).

#### 2. Caractéristiques physico-chimiques du lait

Le lait de vache prélevé du tank à lait est le jour de l'essai présente un pH est de 6,8 et une acidité titrable de 16 °D. La moyenne de ces résultats reste dans l'intervalle du lait frais. Le pH et l'acidité dépendent de la teneur en caséine, en sels minéraux et en ions, des conditions hygiéniques lors de la traite, de la flore microbienne totale et son activité métabolique (**Alais, 1984 ; Mathieu, 1998**).

La densité mesurée à 20°C est de 1,028 (Tab.1). Elle dépend de la teneur en matière sèche et en matière grasse (**Mathieu, 1998**). La matière sèche enregistre une moyenne de 109.7 g/l qui est inférieur à la norme de 130 g/l pour le lait de vache frais. La teneur moyenne en matière grasse, qui varie en fonction du stade de lactation et de l'alimentation, est dans l'intervalle de 28 à 32 g/l avancé **Mathieu (1989)**. Elle est de 30 g/l.

La teneur moyenne en protéine totale, qui est de 28.5 g/l, est inférieure à la moyenne de 30 à 35 g/l pour le lait de vache. Cette matière protéique contient 23 g/l de protéines coagulables : les caséines.

La valeur moyenne du lactose (43 g/l) est dans la marge de la gamme rapportée par Mathieu (40 - 50 g/l). De même pour la teneur en sels minéraux qui est également faible (7.01 g/l) par rapport à norme du lait de vache qui devrait enregistrée entre 8 à 10g/l.

**Tableau 2.** Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache

<i>Paramètres*</i>	<i>Acidité</i>	<i>pH</i>	<i>Densité</i>	<i>MS</i>	<i>MG</i>	<i>MP</i>	<i>Caséines</i>	<i>Lactose</i>	<i>Minéraux</i>
<b>Lait (g/l)</b>	<b>16</b>	<b>6.8</b>	<b>1028</b>	<b>109.68</b>	<b>30.5</b>	<b>28.53</b>	<b>23</b>	<b>43</b>	<b>7.01</b>

\*Matière sèche (MS) ; Matière grasse (MG) ; Protéines (MP).

### 3. Evaluation du comportement de la protéase d'artichaut en fabrication de fromage à pâte molle

#### 3.1. Bilan matière des deux micro-fabrications

Les deux micro-fabrications de fromage à pâte molle réalisées de façon indépendante, par coagulation du lait de vache par la protéase de l'artichaut d'une part et d'autre part par la chymosine (témoin) étaient effectuées sur un poids moyen de 6 kg de lait de vache entier.

Au cours de chaque fabrication, les lactosérums et les caillés étaient pesés puis des échantillons étaient prélevés en vue de les analyser sur le plan physico-chimique (EST, MP et MG).

Le tableau 2 montre les masses et les teneurs en EST, MP et MG du lait, du lactosérum, et du caillé ainsi que le bilan matière brute et le bilan des principaux constituants des deux de fabrications fromagères réalisées.

**Tableau 3.** Bilan matière de la transformation du lait de vache en fromage à pâte molle

<i>Fabrication de fromage à pâte molle</i>	<i>Poids (kg)</i>	<i>EST (g/kg)</i>	<i>ESD (g/kg)</i>	<i>MG (g/kg)</i>	<i>MP (g/Kg)</i>
<b>Fabrication 1 avec la chymosine</b>					
<b>Lait</b>	6	109.09	78.59	30.5	28.53
<b>Caillé</b>	0.57	503.48	228.58	275.36	240.43
<b>Sérum</b>	5.43	61.05	56.8	4.25	5.61
<b>Bilan matière (%)</b>	<b>0</b>	<b>-5.37</b>	<b>-6.88</b>	<b>-1.33</b>	<b>-3.21</b>
<b>Fabrication 2 avec la protéase de l'artichaut</b>					
<b>Lait</b>	<b>6</b>	109.68	79.48	30.2	28.30
<b>Caillé</b>	0.55	465.91	194.00	271.91	236.62
<b>Sérum</b>	5.44	66.5	61.5	5	6.37
<b>Bilan matière (%)</b>	<b>0</b>	<b>5.63</b>	<b>-7.19</b>	<b>-1.55</b>	<b>-2.10</b>

Le bilan matière consiste à comparer, en poids et en composition, le lait mise en œuvre qui constitue les entrées et les produits issus de la transformation de ce lait (caillé et sérum) qui

constituent les sorties. Il permet d'estimer les constituants du lait entrant en fabrication et qu'on ne retrouvera ni dans le caillé, ni dans le sérum. En conséquence, le bilan matière est un moyen de vérifier le déroulement de la fabrication par le calcul des pertes de fabrication.

Les bilans matière effectués sur les 2 fabrications sont équilibrés et les bilans 'Entrée - Sortie' des principaux constituants sont reproductibles. A noter que **Kouniba et al. (2007)** indiquent que les bilans matière brute négatifs sont liés à l'évaporation et aux pertes du caillé sur les grilles d'égouttage.

### 3.2. Coefficient de rétention et rendement fromager

La notion de coefficients de rétention ou de récupération permet d'exprimer la quantité d'un constituant ou d'un groupe de constituants qui est récupérée dans le produit fini par rapport à la quantité présente initialement dans le lait mis en œuvre.

Le tableau 3 rapporte les coefficients de récupération de l'EST, l'ESD ; la MG et le MP obtenus à la fin du démoulage.

**Tableau 4.** Caractéristiques de la fabrication de fromage à pâte molle

Fabrications	RF <sub>f</sub> (kg/100 kg)	RF <sub>C</sub> (kg/100 kg)	Composition du fromage			Coefficients de récupération (%)			
			ES	G/S	HFD	EST	ESD	MG	MP
avec la Chymosine	<b>9.53</b>	<b>10.86</b>	<b>50.35</b>	<b>54.68</b>	<b>68.51</b>	<b>44</b>	<b>27.73</b>	<b>86.06</b>	<b>80.33</b>
avec la Cynarase	<b>9.26</b>	<b>10.81</b>	<b>46.59</b>	<b>58.36</b>	<b>73.35</b>	<b>39.36</b>	<b>22.61</b>	<b>83.43</b>	<b>77.48</b>

Nous constatons que dans les 2 essais de transformation du lait en fromage, les coefficients de rétention en matière sèche, en matière grasse et en matière protéique coagulable sont légèrement supérieures pour le fromage-chymosine par rapport au fromage-cynarase. Malgré cette légère différence, le rendement fromager n'est pas influencé.

Il est similaire dans les deux fabrications. Néanmoins, on remarque que le fromage obtenu par coagulation du lait avec l'extrait coagulant de la fleur d'artichaut est plus humide. Ceci montre que le fromage-cynarase a tendance à être plus friable et onctueux que le fromage-chymosine. Rappelant que le rendement fromager correspond à la quantité de fromage que l'on peut obtenir avec une quantité fixée de lait. Il varie principalement en fonction de la quantité d'eau retenue

dans le fromage et de la teneur du lait mise en œuvre en protéines et en matières grasses (**Hurtaud et al., 2001**).

D'après les résultats présentés dans le tableau 3, nous constatons que le rendement fromager est de 10% dans le deux essais. Ces résultats sont en dessous des ceux indiqués par la bibliographie.

Selon **Mietton (1991)**, le rendement en fromage à pâte molle est de l'ordre de 14 à 15%. Ceci est attribué à la composition du lait mise en œuvre en protéines et plus exactement en protéines coagulables : les caséines. Cela nous permet de conclure que si un lait est pauvre en protéines et en extrait sec total, les rendements en fromage seront faibles (Villette, 2016).

D'après les résultats présentés dans le tableau 3, on peut considérer que la transformation de 10 litres de lait de vache d'un extrait sec de 109 g/kg avec 30 g/kg de matière grasse et 28 g/kg de protéines produit 1 kg de fromage, que ça soit en utilisant la protéase de l'artichaut ou la chymosine.

En finalité, les résultats que nous avons présentés se limitent au comportement de la protéase de fleur de l'artichaut au cours de l'étape de transformation du lait en fromage. La qualité gustative du produit final c'est-à-dire après affinage n'a pas été évaluée. En effet, le fromage à pâte molle est un produit évolutif et ses caractéristiques gustatives se modifient en fonction de son degré d'affinage. La fermeté de la pâte du fromage dépend du degré de protéolyse exercé par l'agent coagulant. La pâte peut être un peu ferme ou plus crémeuse. La croûte du fromage à pâte molle doit être mince et régulière. La couleur de la pâte moelleuse et fondante varie de l'ivoire au jaune clair. L'intensité de son goût est influencée par les produits libérés lors de l'hydrolyse des caséines par la protéase au cours de l'affinage. Le goût peut aller du doux-fruité à l'amer.

## *Conclusion et perspectives*

---

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude avait pour objectif l'utilisation de l'extrait de protéase végétale « cynarases » de la fleur d'artichaut comme coagulant dans la fabrication d'un fromage à pâte molle.

Au stade du seul essai de micro-fabrication d'un fromage à pâte molle, il apparaît clairement que l'extrait protéolytique végétal a montré un comportement similaire à celui de la chymosine : l'enzyme de référence. L'extrait protéolytique de la fleur de l'artichaut, caractérisé par une activité coagulante de 1.1 MCU/ml, permet la production d'un fromage de qualité et de rendement fromager similaire au fromage témoin obtenu par coagulation à la chymosine.

La qualité du lait a grandement influencé la composition du fromage et le rendement fromager. Pour les deux essais, le rendement fromager est de 10% ce qui est inférieur aux données techniques qui préconisent un rendement en fromage à pâte molle de l'ordre de 14 à 15%.

Toutefois, la qualité gustative du produit final, c'est-à-dire après affinage, n'a pas été évaluée. La protéolyse est le principal événement biochimique survenant dans le processus d'affinage. Les produits d'hydrolyse protéolytique conditionnent la texture et la saveur du fromage. Le coagulant de la fleur d'artichaut qui n'a pas affecté le rendement fromager pourrait-il affecter les caractéristiques organoleptiques du produit final ?

Par ailleurs, les contacts que nous avons liés avec les agriculteurs cultivant l'artichaut nous ont éclairés sur la nécessité d'évaluer la rentabilité de l'utilisation de l'artichaut dans le cadre de la production d'enzymes protéolytiques.

Le choix de la variété devrait être également pris en compte. Les variétés cultivées dans l'Algérois sont des variétés tardives, c'est-à-dire que la fleur de l'artichaut ne peut être disponible qu'en fin mai-début juin.

## *Références Bibliographiques*

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR. (1980). Accueil des normes françaises ; Lait et produits laitiers : méthodes d'analyse. 1ère édition.

Alais.C, (1984)., Principes des techniques laitières , science du lait . Ed.SEPAC . 4 ed.68.

Beka RG, Krier F, Botquin M, Guiama VD, Donn P, Libouga DG, Mbofung CM, Dimitrov K, Slomianny MC, Guillochon D, Vercaigne-Marko D (2014) Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanitesaegyptiaca* fruit pulp. *Int Dairy J* 34:25–31

Brule, G., and Lenoir, J., (1987). La coagulation du lait. In le Fromage. 2Ed.A.ECK, TEC et DOC Lavoisier.

Brule, G., Lenoir, J., and Remeuf,R., ( 1997). La micelle de caséine et la coagulation du lait. In. Le fromage de la science à l'assurance qualité.3Ed. A.ECK, G.C. GILLIS, TEC et DOC Lavoisier.

Bruno MA, Trejo SA, Aviles XF, Caffini NO, Lopez LMI (2006) Isolation and characterization of hyeronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromeliahieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Protein J* 25:224–231

Choisy, C., Desmazeud, Gripon, J.C., Lamberet, G., Lenoir, J., 2000. The biochemistry of ripening, dans *Cheesemaking, from science to quality assurance*, Eck, A., Gillis, J.C., TEC & DOC, Paris, 82-143

Cordeiro MC, Pais MS, Brodelius PE (1998) In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer, Heidelberg.

Egito AS, Girardet JM, Laguna LE, Poirson C, Mollé D, Miclo L, Humbert G, Gaillard JL (2007) Milkclotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine casein. *Int Dairy J* 17:816–825

Farkye, N. Y. (2004). Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 91-98.

Garg SK. and Johri BN. (1994). Rennet: current trends and future research. *Food Reviews International*. Taylor et Francis.

Goursaud, J., (1999) . Réacteurs enzymatiques à enzymes libres et à enzymes immobilisées. In. *Biotechnology*. 5Ed R . Scriban 376 390.

Guizani, N., Al-Attabi, Z., Kasapis, S., et Mahgoub Gaafar, O. (2006). Ripening profile of semi-hard standard goat cheese made from pasteurized milk. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 523-532

Hashim MM, Mingsheng D, Iqbal MF, Xiaohong C (2011) Ginger rhizome as a potential source of milk-coagulating cysteine protease. *Phytochem* 72:458–464

Heimgartner U, Pietrzak M, Geertsen R, Brodelius P, Figueiredo AC, Pais MSS (1990) Purification and partial characterization of milk-clotting proteases from flowers of *Cynaracardunculus*. *Phytochem* 29:1405–1410.

Holt, C., (1997.). Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions, *J. Dairy Sci*, 80 supplement 1, 111.

- Jacob, M., Jaros, D., et Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14-33.
- Katsaros GI, Tavantzis G, Taoukis PS (2010) Production of novel dairy products using actinidin and highpressure as enzyme activity regulator. *Innov Food SciEmergTechnol* 11:47–51
- Llorente BE, Brutti CB, Caffini NO (2004) Purification and characterization of a milk-clotting asparticproteinase from globe artichoke (*Cynarascolymus* L.). *J Agric Food Chem* 52:8182–8189.
- Mathieu, J., (1998). *Initiation à la physico chimique du lait*. Ed. TEC et DOC. Lavoisier. 220 pp.
- Mietton, B., Desmazeaud, M., De Roissart, H., and Weber, P., (1994). Transformation du lait en fromage. in. *Bactéries lactiques*. V2. H. DE. ROISSART, F.M. Luquet. Ed, Loriga.
- McSweeney, P. L. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 127-144.
- Paccalin, J., Galantier, M., (1985). Valeur nutritionnelle du lait et des produits laitiers. In. *Laits et produits laitiers*. Ed. F. M. Luquet. TEC et DOC. Lavoisier
- Rawlings ND, Barrett AJ (2004) Families of serine peptidases. *Methods Enzymol* 244:19–61.
- Roseiro LB, Barbosa M, Ames JM, Wilbey RA (2003) Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara* L. for the production of ovine cheeses. *Int J Dairy Technol* 56:76–85
- Schaller A (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220:183–197
- Schmidt, D. G. (1980). Colloïdal aspects of casein. *Neth. Milk. Dairy. J.* 34, 42 64.
- Tripathi P, Tomar R, Jagannadham MV (2011) Purification and biochemical characterization of a novel protease streblin. *Food Chem* 125:1005–1012.
- Uchikoba T, Kaneda M (1996) Milk-clotting activity of cucumisin, a plant serine protease from melon fruit. *ApplBiochemBiotechnol* 56:325–330.
- Vairo-Cavalli S, Claver S, Priolo N, Natalucci C (2005) Extraction and partial characterization of acoagulant preparation from *Silybummarianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *J Dairy Res* 72:271–275
- Verissimo P, Faro C, Moir AJG, Lin Y, Tang J, Pires E (1996) Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynaracardunculus* L. *Eur J Biochem* 235:762–768
- Vétier N., Banon S., Ramet J.P, Hardy J. (2000). Hydratation des micelles de caséine et structure fractale des agrégats et des gels de lait. *Le Lait*, INRA Editions, 80 (2), .237-246.
- Villette A. (2016). Améliorer son rendement fromager. In *Réussir la chèvre*, 332-336

# **ANNEXE**

## **ANNEXE**

### **Les appareils et matériels utilisés sont :**

- Balance
- Bain-marie à 45 C
- Four à moufle
- Etuve.
- Broyeur
- Agitateur magnétique
- Agitateur-plaque chauffante.
- pH mètre
- pipettes pasteur.
- Papier filtre wattman N°3
- Pompe à vide.
- Spectrophotomètre UV-Visible
  
- Centrifugeuse Gerber
- Humidificateur
- Thermomètre
- Lactodensimètre

## ملخص:

هذه الدراسة مخصصة لتقييم قدرة البروتياز المأخوذة من زهرة الخرشوف على تخثير الحليب في صنع الجبن الطري عوضا عن الكيموسين المؤتلف المستود.

في هذه الدراسة قمنا بإنجاز تجربة تطبيقية لإنتاج الجبن الطري من نوع الكمبيري بحليب البقر. في المحاولة الأولى تم دمج مستخلص زهرة الخرشوف لتخثير ستة لترات من الحليب وفي المحاولة الثانية استعملنا الكيموسين المؤتلف كمخثر. في كلا الحالتين تم إجراء التحليل الكيميائي للحليب والخثارة من أجل تحديد موازنات الإنتاج وعوائد الجبن

**الكلمات المفتاحية:** بروتياز نباتي، زهرة الخرشوف، تخثر الحليب، جبن

## RESUME

Cette étude est consacrée à l'évaluation de l'aptitude fromagère de la protéase issue de la fleur de l'artichaut (*Cynara scolymus*). Elle est utilisée en fabrication d'un fromage à pâte molle comme alternative aux coagulants importés et plus particulièrement à la chymosine recombinante.

Dans ce travail, l'effet de l'incorporation de l'extrait de la fleur d'artichaut dans la fabrication de fromages de lait de vache à pâte molle est étudié. Deux micro-fabrications de six litres de lait chacun ont été transformés en fromages. Ces deux essais ont été coagulés, avec l'extrait de la fleur d'artichaut et de la chymosine recombinante de manière séparée. La composition chimique des laits et des caillés a été réalisé en vue de déterminer les bilans de fabrication et les rendements fromagers.

**Mots clés :** Protéase végétale, Artichaut, coagulation du lait, Fromage.

## ABSTRACT:

This study is devoted to evaluate the cheese-making ability of the vegetable protease obtained from the flower of the artichoke (*Cynara scolymus*). It is used in the manufacturing of a soft soft-paste cheese as an alternative to imported coagulants and particularly to recombinant chymosin.

In this work, the effect of incorporating artichoke flower extract in the production of soft cow's milk cheeses is studied. Two micro-fabrication of six liters of milk was transformed into cheeses. These two trials were coagulated separately with the extract of the artichoke flower and the recombinant chymosin. The chemistry composition of milk and curds was carried out in order to determine the production balance sheets and cheese yields.

**Keywords:** Vegetable protease, Artichoke, milk coagulation, Cheese.

